

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-168391

(43)公開日 平成9年(1997)6月30日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
// (C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

審査請求 有 発明の数1 F D (全 8 頁)

(21)出願番号	特願平8-353383	(71)出願人	000001926
(62)分割の表示	特願昭62-271494の分割		塩野義製薬株式会社
(22)出願日	昭和62年(1987)10月26日		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
		(72)発明者	浅香 純一郎
			大阪府堺市北旅籠町西1-1-29
		(72)発明者	藤原 孝司
			奈良県奈良市帝塚山3-7-2
		(72)発明者	桑島 吾郎
			兵庫県尼崎市杭瀬寺島1-4-41塩野義製
			薬寺江寮
		(72)発明者	近藤 栄二
			大阪府池田市石橋4-22-18
		(74)代理人	弁理士 高山 裕貢

(54)【発明の名称】 排出機能を有するフラジェリンのN端側アミノ酸断片の用途

(57)【要約】

【課題】 本発明は所望のペプチドを菌体外に排出させる技術に関する。

【解決手段】 フラジェリンのN端をコードするDNA分子の直下流に所望の外来ペプチドをコードする遺伝子を接続し、適当な発現ベクターに挿入して、フラジェリンと目的のペプチドからなる融合蛋白質を発現させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】、大腸菌フラジェリンのうち排出機能を有する以下のアミノ酸配列、またはそのアミノ酸配列に1個または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および付加の中から選ばれる少なくとも1つの変異を有する変異型アミノ酸配列であってそのアミノ酸配列と同等の排出機

能を有するアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNA分子であって、その3'末端側に所望のペプチドをコードするDNA分子が付加されている該DNA分子を有するベクターを利用して所望のペプチドを生産する方法：

```

MetAlaGlnValIleAsnThrAsnSerLeu
 1           5           10
SerLeuIleThrGlnAsnAsnIleAsnLys
           15           20
AsnGlnSerAlaLeuSerSerSerIleGlu
           25           30
ArgLeuSerSerGlyLeuArgIleAsnSer
           35           40
AlaLysAspAspAlaAlaGlyGlnAlaIle
           45           50
AlaAsnArgPheThrSerAsnIleLysGly
           55           60
LeuThrGlnAlaAlaArgAsnAlaAsnAsp
           65           70
GlyIleSerValAlaGlnThrThrGluGly
           75           80
AlaLeuSerGluIleAsnAsnAsnLeuGln
           85           90
ArgValArgGluLeuThrValGlnAlaThr
           95          100
ThrGlyThrAsnSerGluSerAspLeuSer
          105          110
SerIleGlnAspGluIleLysSerArgLeu
          115          120
AspGluIleAspArgValSerGlyGlnThr
          125          130
GlnPheAsnGlyValAsnValLeuAlaLys
          135          140
AsnGlySerMetLysIleGlnValGlyAla
          145          150
AsnAspAsnGlnThrIleThrIleAspLeu
          155          160
LysGlnIleAspAlaLysThrLeuGlyLeu
          165          170
AspGlyPheSerValLysAsnAsnAspThr
          175          180
ValThrThrSerAlaProValThrAlaPhe
          185          190
GlyAlaThrThrThrAsnAsnIleLysLeu
          195          200
ThrGlyIleThrLeuSerThrGluAlaAla
          205          210
ThrAspThrGlyGlyThrAsnProAlaSer
          215          220

```

```

I l e G l u G l y V a l T y r T h r A s p A s n G l y A s n
      225                      230
A s p T y r T y r A l a L y s I l e T h r G l y G l y A l a
      235                      240
S e r .

```

【請求項2】 該ペプチドが、上記アミノ酸配列においてその第1位のNet、および／または第240位のAlaおよび第241位のSerが欠失しているペプチド

である請求項1記載の方法。

【請求項3】 以下の塩基配列からなるDNA分子を有するベクターを利用する請求項1記載の方法：

```

ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTC 30
TCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAG 60
AACCAGTCTGCGCTGTCGAGTTCTATCGAG 90
CGTCTGTCTTCTGGCTTGCGTATTAACAGC 120
GCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATT 150
GCTAACC GTTTACCTCTAACATTAAAGGC 180
CTGACTCAGGCGGCCCGTAACGCCAACGAC 210
GGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGC 240
GCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTTACAG 270
CGTGTGCGTGAACTGACGGTACAGGCCACT 300
ACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCT 330
TCTATCCAGGACGAAATTAAATCCCGTCTG 360
GATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACC 390
CAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGGCAAAA 420
AATGGCTCCATGAAAATCCAGGTTGGCGCA 450
AATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTG 480
AAGCAGATTGATGCTAAAACTCTTGGCCTT 510
GATGGTTTTAGCGTTAAAAATAACGATACA 540
GTTACCACTAGTGCTCCAGTAACTGCTTTT 570
GGTGCTACCACCACAAACAATATTAACTT 600
ACTGGAATTACCCTTTCTACGGAAGCAGCC 630
ACTGATACTGGCGGAACCTAACCCAGCTTCA 660
ATTGAGGGTGTTTATACTGATAATGGTAAT 690
GATTACTATGCGAAAATCACCGGTGGTGCA 720
AGCTAA.

```

【請求項4】 第1位のAから第3位のT、および／または第718位のGから726位のAまたは第724位のTから第726位のAが欠失している請求項3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は排出機能を有するフラジェリンの一部をコードするDNA分子を利用する所望のペプチドを生産する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の遺伝子工学の発展により、目的のペプチドをコードする遺伝子をベクターに組み込み、大腸菌などの細菌に導入して該ペプチドを大量に得ることは容易な技術となりつつある。しかし一般に発現したペプチドは細胞内に蓄積されるため、生成された蛋白質が細胞の成育増殖を阻害したり、過剰に生成されると負のフィードバックによつて生産性が抑制されることがある。

また、目的の蛋白質を採集するためには、まず細胞を採集破壊し、該細胞破壊物から目的の蛋白質を精製しなければならない。この細胞破壊物中には多くの不純物が含まれ、その一部は人体に有害であり、そこから純粋な目的の蛋白質を得ることは必ずしも容易なことではない。

【0003】細胞膜を構成する蛋白質や分泌蛋白質などは、その一端に細胞内外の膜を通過するために必要なアミノ酸配列シグナルペプチドを持つ前駆体ポリペプチドとして合成され、膜通過の際に膜に存在するペプチダーゼによりシグナルペプチド部分は切断され、本来の蛋白質分子となりその活性および機能を発揮する。細胞内に蓄積された目的のペプチドを精製する困難さを解決し、目的の蛋白質の生産性を向上させるため、上記の生体の分泌システムを利用して、目的のペプチドを細胞外に分泌せよとする試みがなされてきた。例えば、バチルス・ズブチリスの α -アミラーゼプロモーターおよびシグナル配列を有する分泌ベクターによる、大腸菌 β -ラ

クタマーゼの分泌(ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.) 95, 87-93 (1984))、同ベクターシステムによるマウス IFN- β の分泌(ジーン(Gene) 3 4, 1-8 (1985))、大腸菌のアルカリフォスファターゼプロモーターおよびシグナル配列を有する分泌ベクターによるヒトIFN- α の分泌生産(ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.) 97, 1429-1436 (1985))、などが挙げられる。

【0004】また、細胞内で合成された蛋白質が細胞外に出るメカニズムとしては上記の分泌システムだけでなく排出(excretion)システムが知られている。例えば、細菌の鞭毛を構成するフラジェリンなどがこの排出システムによつて菌体外に排出される。排出システムは、分泌と異なり、合成されたペプチドはシグナルペプチドを有さず、ペプチターゼによつて切断されることなく、そのまま菌体外に排出されて機能を発揮する(ザ・ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J.Bacteriol.) 15 9, 1056-1059 (1984))。大腸菌のフラジェリンをコードする遺伝子はhag遺伝子と呼ばれ、既に pBR322や入アージにクローニングされており(日本遺伝子学会第57回大会プログラム・予稿集、p63(1985)、ザ・ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J.Bacteriol.) 130, 736-745 (1977))、そのDNA配列の全部が明らかにされている(ザ・ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J.Bacteriol.) 168 3 1479-1483 (1986))。

【0005】本発明者らは先にhag 遺伝子を利用した排出ベクターを構築した。即ち、hag遺伝子内の排出に必要な構造を損なわない場所に適当な外来DNA挿入の為のリンカーを挿入した。この場合、外来DNAにコードされるペプチドはフラジェリン蛋白質にサンドイツチにされた雑種蛋白質として菌体外に排出される。排出ベクター構築に際しては hag 遺伝子の全部を用いるだけでなく、フラジェリン蛋白質の排出に不要な部分を欠損させてその一部を用いる事ができ、その不要部分は hag 遺伝子の中央部分であると推定されていた(特開昭 63-12286)。しかし、排出に際してのフラジェリン蛋白質の必須部分についてはまだ不明であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】従来の分泌ベクターはその種類によつて分泌されるペプチドは制限される。すなわち、一定のプロモーターおよびシグナル配列に、いかなる目的のペプチドをコードするDNAを組み込んでも分泌されるというものでなく、分泌されるペプチドは一定のものであり、分泌ベクターに組み込んでも分泌されないペプチドは数多い。本発明者らは、大腸菌のフラジェリンをコードする hag 遺伝子をクローニングし、その全構造を明らかにした。さらに、その全構造をもとにフラジェリンの排出機構が目的とする外来の蛋白質の菌体外生産に利用可能である事も既に示した(特開昭 63-12286)。この場合、排出ベクター構築に際して

は、フラジェリン蛋白質の排出に不要な部分を欠損させ、その部分に外来のペプチドをコードするDNA部分を挿入するリンカーDNAを挿入し、最終的には外来のペプチドはフラジェリン蛋白質にサンドイツチされて雑種蛋白質として菌体外に排出される。排出に際してのフラジェリン分子の不要な部分については、分子中央部分である事が示唆されているが、排出に必須な部分については不明である。

【0007】フラジェリン蛋白質の排出に必要な部分が明らかにされれば、その部分のペプチドをコードするDNAを排出させたい外来の蛋白質をコードするDNAに連結させる事により、目的とする外来の蛋白質をフラジェリンの排出機構を利用して排出させる事が可能である。また分泌ベクターによつて目的の蛋白質が培地中に分泌されても培地からの精製はなお容易でないが、フラジェリン蛋白質の一部ペプチドとの雑種蛋白質として排出されれば、容易に作成できる抗フラジェリン抗体を利用したアフィニティクロマトグラフィー技法で、雑種蛋白質は簡単に培地から採集できる。以上の様に本発明のフラジェリンの排出に必須な部分をコードするDNAは排出ベクターの構築を可能にする非常に有用な遺伝子断片となる。

【0008】

【課題解決手段】本発明者らは目的となる外来蛋白を菌体外に産生させるシステムに関して、フラジェリンの排出機構に着目し、フラジェリンの排出に必要な部分(ペプチド)を明らかにした。該ペプチドをコードするDNAを適当なベクターに挿入し、その直下流に排出させたい外来蛋白をコードするDNAを連結すれば、該蛋白質が上記ペプチドとの雑種蛋白質として菌体外に排出され蓄積する事が予測される。排出された雑種蛋白質は抗フラジェリン抗体を利用したアフィニティカラムクロマトグラフィーで簡単に採集できる。得られた雑種蛋白質は適当に切断してフラジェリン由来のペプチドを除去すれば目的の蛋白質が得られる。また分泌システムによつては菌体外に産生できなかった外来のペプチドを排出できる可能性を有する。

【0009】以下、プラスミドpFD201上のhag遺伝子を例にあげて本発明の基本をなすフラジェリンの排出に必要な部分(ペプチド)を発見した過程を説明する。また本発明を追試する際にはプラスミドpBR322/hag9(微工研条第1232号に含まれている)、宿主には大腸菌K-12 JA11(微工研条第1233号)を使用する事ができる。本発明の実施例の一部においては宿主の大腸菌としてC600r-m-hag::Tn10株を用いたが、本発明を追試する際には、微工研に寄託されているK-12 JA11株を用いるのが便利である。以下の実施例の一部に示すように、本発明のベクターはK-12 JA11株に於ても不都合なく使用し得る。プラスミドpFD201は特開昭 63-12286の実施例に記載されているpFD202と同時に得られた

ものであり、上記実施例5-(C)の項目において、実施例5-(B)の反応物を大腸菌 K-12 株の C600r-m-hag::Tn10 に形質転換した際出現した形質転換体のうち、制限酵素 SmaI で切断されるプラスミドを持つ株の中から採取される。

【0010】即ち、上記実施例1で得られた pBR322/hag9 (微工研条寄第1232号に含まれている)をBamHIで消化し、BamHI断片の一部を削除しT4DNAリガーゼで連結して pBR322/hag93 を得る。これをDNaseIで処理して切断しBcl31で部分消化する。これをDNAポリメラーゼIで修復し、HindIIIリンカーを加えT4DNAリガーゼで連結して、pFD1、pFD2およびpFD3を得た。そのうち、pFD2をHindIIIで切断し、Bcl31で部分消化する。これにHindIII-SmaI-BglIIIリンカーを加えT4DNAリガーゼで連結した。この反応物を C600r-m-hag::Tn10 株に導入して得られた形質転換体のうち、遊走性を示し、その株が有するプラスミドが SmaI で切断される株を選択し、pFD202を得た。この時、遊走性は示さないがSmaIで切断されるプラスミドを有する株が本発明の pFD201 を有していることを見出した。

【0011】得られた上記 C600r-m-hag::Tn10 (pFD201) から常法に従ってプラスミド pFD201 を精製し、制限酵素 SmaI によつて切断される近辺の塩基配列を決定した。SmaI 切断点の上、下流それぞれ約20塩基のシーケンスを決定するだけで pFD201 が運搬する全変異hag遺伝子のシーケンスを推定できる(特開昭 63-12286号明細実施例5-(c)に記載の pFD202 上の SmaI 切断点近辺のDNAシーケンスと同様に行なえばよい)。塩基配列の決定は従来のマクサム・ギルバート法やジデオキシヌクレオチド鎖終止法に従えばよい。pFD201 が運搬する変異 hag 遺伝子の全塩基配列は、配列番号: 1に示す通りである。724位にアミノ酸翻訳停止コドンの TAA が存在し、この変異hag遺伝子はもはやフラジェリン蛋白質を合成する事ができなくなっており、フラジェリンのアミノ末端側239個のアミノ酸残基とリンカーDNAによりカルボキシル末端側に付加された2個のアミノ酸残基より成る都合241アミノ酸残基より成るペプチドを合成する事が推定できる。

【0012】実際にこの pFD201 を宿主大腸菌JA11に導入したJA11(pFD201)株の培養液中にはアミノ末端側がNH₂-Ala-Gln-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-Ser-Leu-Ser-Leu-Ile-Thr-Gln-Asn-Asn-Ile-Asn-Lys-Asn-Gln-Ser-Ala-Leu-Serである分子量約3万の蛋白質が蓄積している事を発見した。この発見の経緯について説明する。JA11(pFD201)の培養後の遠心上清を膜ろ過により濃縮を行ない、得られた試料を常法の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分離すると分子量約3万の特異的な蛋白質が多量かつ明瞭にバンドとして観察される。この蛋白質をゲルから抽出し、高圧液体クロマトグラフィーで精製後、得られた蛋白質について、アミノ基末端側のアミノ酸残基の

決定を行なった。その結果、前記のアミノ酸残基の並びが決定された。以上の様に JA11(pFD201)株のフラジェリンはアミノ末端側から241個のアミノ酸残基より成るペプチドとして合成され菌体より排出されている(配列番号: 1参照)。

【0013】本発明は配列番号: 1の塩基配列中第1位から第726位までの塩基配列に限定されるものでなく、配列番号: 1に示される第1位から第241位までのアミノ酸配列又は同等の排出機能を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA分子を有するベクターを利用して所望のペプチドを生産する方法も本発明の範囲内である。特に、240-241位のAlaSerはリンカー由来のアミノ酸配列であり、これは排出に必須ではないと考えられるので、第1位から第239位のアミノ酸配列をコードする遺伝子を利用する方法は本発明に含まれる。同様の理由により、配列番号: 1の塩基配列のうち第1位から第717位までの塩基配列からなるDNA分子を利用する方法も本発明に含まれ、さらに終止コドンもTAAに限定されるものではないので第1位から第723位の塩基配列からなるDNA分子を利用する方法も本発明に含まれる。また、フラジェリンのN末端のMetも排出に必須ではないと考えられるので、上記塩基配列から該N末端Metをコードする塩基配列を除いたものを利用する方法も本発明に含まれる。

【0014】又pFD201上、変異hag遺伝子を得る工程(特開昭 63-12286号実施例5-(A)参照)のDNAの切断、および消化はランダムであり、同様の性質を有する塩基数従つてアミノ酸残基数が異なる位置でペプチド鎖を終末させるコドン(TAAあるいはTGAあるいはTAG)を挿入する事ができる事は当業者には容易に推定できる。従つて本発明は実施例に記載された241個のアミノ酸残基より成るペプチドをコードするDNA分子を利用する方法に限定されるものではなく、上記の工程によつて得られるDNA分子はもちろんの事、上記の性質を有するhag遺伝子上の塩基配列からなるDNA分子を利用する方法は全て本発明に含まれる。なお、配列番号: 1に記載したアミノ酸配列以外の変異型アミノ酸配列、即ち大腸菌フラジェリンのうち排出機能を有するアミノ酸配列に1個または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および付加の中から選ばれる少なくとも1つの変異を有する変異型アミノ酸配列であつてそのアミノ酸配列と同等の排出機能を有するアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNA分子は例えば、Nucleic Acids Res. Vol. 10, 6487-6500(1982)、Nucleic Acids Res. Symposium Series No. 16, 287-290(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 82, 488-492(1985)等に記載の手法によつて調製することができる。本発明を追試し本発明の塩基配列を得る場合、上記の行程を追試する必要はなく、大腸菌K12JA11(pFD201)(微工研菌寄第9671号)を使用すれば容易に該遺伝子を得ることができる。

なお、大腸菌K-12 JA11 (pFD201) は、昭和62年10月22日より微工研菌寄第9671号として茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号の微生物工業技術研究所に寄託されている。

【0015】

【実施例】

実施例1. プラスミドpFD201の構築と採取

プラスミドpFD201は、特開昭 63-12286の実施例に記載のpFD202と同時に得られたものであり、pFD202と全く同様にして構築採取できる。即ち、プラスミドpFD201は上記実施例5-(c)において、実施例5-(B)の反応物を大腸菌K-12株のC600r-m-hag::Tn10株に形質転換した際、出現した形質転換体のうち、制限酵素SmaIで切断されるプラスミドを持つ株の中から採取された。即ち、上記実施例1で得られた pBR322/hag9 (微工研条寄第1232号に含まれている) をBamHIで消化し、BamHI断片の一部を削除しT4DNAリガーゼで連結して pBR322/hag93 を得る。これをDNaseIで処理して切断しBa131で部分消化する。これをDNAポリメラーゼIで修復し、HindIIIリンカーを加えT4DNAリガーゼで連結して、pFD1、pFD2およびpFD3を得た。そのうち、pFD2 をHindIIIで切断し、Ba131で部分消化する。これにHindIII-SmaI-BglII リンカーを加えT4DNAリガーゼで連結した。この反応物を C600r-m-hag::Tn10 株に導入して得られた形質転換体のうち、遊走性を示し、その株が有するプラスミドが SmaI で切断される株を選択し、pFD202を得た。この時、遊走性は示さないがSmaIで切断されるプラスミドを有する株が本発明の pFD201 を有していることを見出した。

【0016】実施例2. JA11(pFD201)の確立

実施例1で得られたC600r-m-hag::Tn10(pFD201)株から特開昭 63-12286の実施例(1)-(D)-(a)に記載の方法のうち、W3623Hfla-am76(pBR322/hag9)株をC600r-m-hag::Tn10(pFD201)株に置き換える他は同様の操作を行ない、cc-DNAのpFD201を調製する。次いで、特開昭 63-12286実施例(1)-(C)に記載した方法のうち、W3623Hfla-am76株をJA11株に、又、プラスミドDNAをpFD201cc-DNAに置き換える他は同様の操作を行ない、JA11(pFD201)株を確立した。

【0017】実施例3. JA11(pFD201)の培養

JA11(pFD201)株をバクトトリプトン1%(デیفコ社)、イーストエキストラクト0.5%、塩化ナトリウム0.5%、寒天1.5%、アンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地(pH7.0-7.2)に拡げ、37℃で1晩培養する。生じたコロニーをLB培地(上記LB寒天培地より寒天1.5%を省く組成)5mlに植菌し、28℃で1晩振盪培養を行なう。培養液1mlを、上記LB培地100mlに植菌し28℃で一晩振盪培養を行なう。

【0018】実施例4. 培養液からのフラジェリン断片の精製

実施例3の培養液100mlをソーバル高速冷却遠心機、ローターGSAを用いて、4℃で5000回転10分間の遠心を行な

う。得られた上清に再度上記の遠心操作を行なう。その結果上清95mlを得た。次にこの上清を限外濾過器(UHP-43、アドバンテック・東洋社)を用い濃縮を行なう。上記濾過器にフィルター(UK-10(43mmφ)、アドバンテック・東洋社)をセットし、濾過器の試料室内に精製水を注入し、窒素ガス(1kg/cm²圧)の圧力を利用してフィルターを精製水で洗う。次いで培養上清を45ml、試料室内に注入し1kg/cm²圧の窒素ガスで濾過濃縮する。試料が20mlに濃縮されたら、更に培地上清を25ml加え、再び上記窒素ガス圧をかけ濃縮する。試料が20mlに濃縮された時、培地上清の残り25mlを加え、再び濃縮する。試料が20mlに濃縮された時点で、50mMNaClを含む10mMリン酸ソーダ(pH7.2)緩衝液を25ml加え再び濃縮する。この操作を更に3回繰り返し、最終的に20mlの濃縮された試料を得る。

【0019】実施例5. フラジェリン断片の精製

実施例4で得た試料をいわゆる Laemmli の方法を用いて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で精製する。濃縮ゲルにアクリルアミド5%、ビスアクリルアミド0.13%、125mMTris-HCl (pH6.8)、0.1%SDSを用い、分離ゲルにはアクリルアミド15%、ビスアクリルアミド0.4%、375mM Tris-HCl(pH8.8)、0.1%SDSを用いた。電気泳動用緩衝液としては、25mM Tris、0.192Mグリシン、0.1%SDSの1.4Lを使用した。電気泳動槽はアト-SJ-1060SDを用い、ゲルの厚さは2mmを用いた。濃縮した試料100μlに、試料用緩衝液(125mM Tris-HCl (pH6.8)、4%SDS、5%2-メルカプトエタノール、20%グリセロール、0.005%ブロモフェノールブルー50μl)を加え、4.5mm巾の試料穴に注入する。試料穴はスラブ1枚あたり9個作成する(9レーン)。8個を試料用に、残り1個を分子量マーカー(SDS-PAGE、スタンダード(Low)、バイオ・ラッド社)用に用いる。分子量マーカーはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(1mM)を含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で50倍に希釈し、等容量の前記試料用緩衝液を加え、40μl試料孔に注入した。定電流60mAで3時間電気泳動を行なう。電気泳動後、試料の1レーン、分子量マーカーのレーンの都合2レーンを切り取り、0.25%クマシーブリリアントブルーR-250、50%メタノール、10%酢酸に2時間浸し、染色する。46%メタノール、9%酢酸に浸し、分子量マーカーを電気泳動したものと試料を電気泳動したものを較べて、分子量3万付近の試料レーンに主バンドを認めた。未染色の7個の試料レーンから、主バンドを占めていると推測される位置から、ゲルを切り出した。2枚のスラブについてこの電気泳動を行ない、ゲル断片を都合2個得た。

【0020】アト-社のマツクスイールドGp蛋白回収器AE-3590型の試料カットに透析膜(スペクトラム・メディカル・インダストリーズ社、スペクトラ/ボアー6、

132580) をセットし、上記のゲル断片2個を細かくきざみ、試料カップのゲル用ウェルに入れる。器具に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液(実施例本項のものより SDS を除いたもの)を満たし、アトー社添付の器具説明書に従い、10℃で定電圧350ボルトで2時間電気抽出を行ない、試料カップの回収用ウェルの溶液を約2ml回収する。この回収液をセントリコン-10(アミコン社)を用いて遠心濃縮し、320μlの試料溶液を得た。次に上記試料を高速液体カラムクロマトグラフィー(HPLC)を用いて精製した。カラムにアキアポア-RP-30、10μm(ブラウン・リー・ラボラトリー社)を用い、流速は1分間に1mlで行なつた。上記試料溶液320μlのうち、150μlをカラムにチャージして、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)で10分間洗い流した後、次の10分間でフラクションチューブあたり0.5分で分画しながら、0.1% TFA の100%→0%、アセトニトリル(CH₃CN) 0%→100%の同時濃度勾配で溶出する。12.6分の位置で220nmに吸収を示す中心ピークが検出された。フラクションチュ

ーブ25、26、27、28本目を集め、2mlの精製画分を得た。

【0021】次に上記の精製画分の50μlを Laemmliの方法(実施例本項目参照)で、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分析した。同時に1μgの野生型大腸菌 K[■]12株から精製したフラジェリン(特開昭 63-12286の実施例(2)-(B)-(a)に明記されている)を電気泳動し、両者の染色後のバンドの濃さをデンストメーター(ツアイネツク・ソフトレーザ・スキャニング・デンストメーター、バイオメッド・インストルメント社)で比較したところ、目的の分子量約3万の蛋白が単一バンドとして検出され、精製された量は、約60μgであつた。

【0022】実施例6. アミノ基末端側のアミノ酸シーケンスの分析

実施例5の試料の約15μgを気相プロテインシーケンサー470A(アプライド・バイオシステム社)を用いて、アミノ基末端側のアミノ酸シーケンス分析を行なつた。結果は

1 5 10 15
NH₂-Ala-Gln-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-Ser-Leu-Ser-Leu-Ile-Thr-Gln-Asn-Asn-
20

Ile-Asn-Iys-Asn-Gln-Ser-Ala-Leu-x-と決定した。

このアミノ末端側アミノ酸シーケンスはhag遺伝子の DN A 配列(配列番号:1参照)から推定できるアミノ末端側第2位から第25位までのアミノ酸シーケンスと一致する。

【0023】

【発明の効果】本発明の遺伝子の直下流に目的とする外来のペプチドをコードする遺伝子を接続し、適当な発現ベクターに挿入して、フラジェリンと目的のペプチドからなる融合蛋白質を発現させれば、フラジェリンの排出

機能によって該融合蛋白質が排出される可能性がある。該融合蛋白質が排出されれば抗フラジェリン抗体を用いることにより容易に精製することができる。

【0024】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:1476

配列の型:核酸

配列

ATGGCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAG 60
MetAlaGlnValIleAsnThrAsnSerLeuSerLeuIleThrGlnAsnIleAsnLys
1 5 10 15 20
AACCAGTCTGCGCTGTGAGTTCTATCGAGCGTCTGCTTCTGGCTTGGCTATTACAGC 120
AsnGlnSerAlaLeuSerSerSerIleGluArgLeuSerSerGlyLeuArgIleAsnSer
25 30 35 40
GCGAAGGATGACGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCCTTACCTCTAACATTAAGGC 180
AlaLysAspAspAlaAlaGlyGlnAlaIleAlaAsnArgPheThrSerAsnIleLysGly
45 50 55 60
CTGACTCAGGCGGCCGTAAACGCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGC 240
LeuThrGlnAlaAlaArgAsnAlaAsnAspGlyIleSerValAlaGlnThrThrGluGly
65 70 75 80
GCGCTGTCCGAATCAACAACACTTACAGCGTGTGCGTGAAGTACGGTACAGGCCACT 300
AlaLeuSerGluIleAsnAsnAsnLeuGlnArgValArgGluLeuThrValGlnAlaThr
85 90 95 100
ACCGGTACTAAGTCTGAGTCTGATCTGCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCGCTCTG 360
ThrGlyThrAsnSerGluSerAspLeuSerSerIleGlnAspGluIleLysSerArgLeu

```

      105      110      115      120
GATGAAATTGACCGGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGGTGAACGTGCTGGCAAAA 420
AspGluIleAspArgValSerGlyGlnThrGlnPheAsnGlyValAsnValLeuAlaLys
      125      130      135      140
AATGGCTCCATGAAATCCAGGTTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTG 480
AsnGlySerMetLysIleGlnValGlyAlaAsnAspAsnGlnThrIleThrIleAspLeu
      145      150      155      160
AAGCAGATTGATGCTAAACTCTGGCCTTGATGGTTTACGGTTAAAAATAACGATACA 540
LysGlnIleAspAlaLysThrLeuGlyLeuAspGlyPheSerValLysAsnAsnAspThr
      165      170      175      180
GTTACCACTAGTGTCCAGTAACTGCTTTTGGTGCTACCACCACAAACAATATTAACTT 600
ValThrThrSerAlaProValThrAlaPheGlyAlaThrThrThrAsnAsnIleLysLeu
      185      190      195      200
ACTGGAATTACCTTTCTACGGAAGCAGCCACTGATACTGGCGGAACTAACCCAGCTTCA 660
ThrGlyIleThrLeuSerThrGluAlaAlaThrAspThrGlyGlyThrAsnProAlaSer
      205      210      215      220
ATTGAGGGTGGTTTACTGATAATGGTAATGATTACTATGCGAAAATCACCGGTGGTGCA 720
IleGluGlyValTyrThrAspAsnGlyAsnAspTyrTyrAlaLysIleThrGlyGlyAla
      225      230      235      240
AGCTAAGCTTCCCGGGAGATCTTGGTGACAATGGCGACTGGAGCAACGGCAAATGCAACT 780
Ser***
GTAAGTATGCAAATACTACTAAAGCTACAATATCACTTCAGGCGGTACACCTGTTTCA 840
ATTGATAATACTGCAGGTTCCGCAACTGCCAACCTTGGTGCTGTTAGCTTAGTAAACTG 900
CAGGATTCCAAGGGTAATGATACCGATACATATGCGCTTAAAGATACAAATGGCAATCTT 960
TACGCTGCGGATGTGAATGAACTACTGGTGCTGTTTCTGTTAAACTATTACCTATACT 1020
GACTCTTCGGGTGCCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAACCTGGGCGGAGATGATGGCAA 1080
ACAGAAGTGGTCGATATTGATGGTAAACATACGATTCTGCGGATTAAATGGCGGTAAT 1140
CTGCAACAGGTTTGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTTGCAAATGGTAAACC 1200
ACGGATCCGCTGAAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATTCGGTTCTTCC 1260
CTCGGTGCGGTGCAAAACCGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACCACTACC 1320
AACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCGTATTCAGGACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTCCAAT 1380
ATGTGAAAGCGCAGATCATCCAGCAGGCGGTAACCTCGTGTTGGCAAAAGCTAACCAG 1440
GTACCGCAGCAGGTTCTGTCTCTGCTGCAGGGTTAA

```